



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 103 38 123 B3 2005.07.28

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 103 38 123.6

(51) Int Cl.: C12Q 1/68

(22) Anmeldetag: 15.08.2003

(43) Offenlegungstag: –

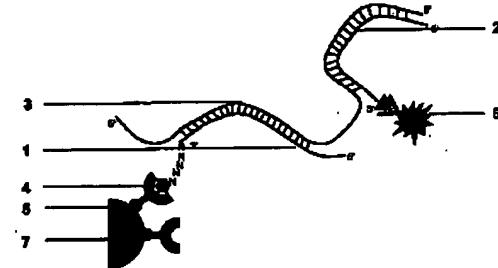
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 28.07.2005

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber: Scanbec GmbH, 06120 Halle, DE	(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften: DE 195 15 891 A1 US 55 69 586 A Rautio, J. u.a.: Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates. Microb. Cell Fact. (28.04.03) 2(1)4, S. 1-9;
(74) Vertreter: Pauling, H., Dipl.-Wirts.-Ing.(FH)Pat.-Ing.Dipl.-Jur., Pat.-Anw., 06124 Halle	
(72) Erfinder: Breitenstein, Antje, Dr., 06114 Halle, DE; Rasilainen, Tarja, Oulu, FI; Neubauer, Dieter, Prof. Dr., Oulu, FI	

(54) Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der Sandwich-Hybridisierungs-Methode dadurch gekennzeichnet, dass
a) gattungsspezifisch zum Nachweis der Gattung Legionella als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGT-CAAGGGTAGG,
b) artspezifisch zum Nachweis von Legionella pneumophila als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCT-GACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TTCGCCGCCCTCTG-TATCG-3';
e) artspezifisch zum Nachweis von Legionella feeleii als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGC-CACTAACCTCATTTCAT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAACCACCTACG-CACC-3' und
d) artspezifisch zum Nachweis von Legionella jordanis als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCATCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CTTACGGTC-CCCAGCTTTT-3';
verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von 50–55° C erfolgt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der Sandwich- Hybridisierungs- Methode.

Stand der Technik

[0002] Legionella spp. sind gram- negative, stäbchenförmige und fakultative intrazelluläre Pathogene. Es werden mehr als 42 Spezies mit 64 Sero- Gruppen unterschieden.

[0003] Sie werden als intrazelluläre Parasiten von Amöben und Ciliaten normalerweise in wässriger Umgebung sowie in nassen Boden gefunden. Sie werden auch in oder an künstlich hergestellten Plätzen oder Produkten wie Kühltürmen, klinischen Beatmungsgeräten, Whirlpools oder Duschen gefunden.

[0004] Der Mensch infiziert sich mit Legionellen nach dem Einatmen kontaminiert Aerosol- Aerosol- Tropfen aus den oben erwähnten Habitaten. In der Lunge fallen die Legionella- Bakterien Makrohagen und können eine Form der Lungenentzündung verursachen, bekannt als Legionärs- Krankheit. Die Symptome beginnen mit schwachen Husten, Unwohlsein, Muskelschmerzen, leichten Fieber, sowie gastrointestinale Störungen und steigern sich zu hohen Fieber, Alveolitis und Bronchitis. Legionella pneumophila ist der wichtigste Erreger für die Legionellose, aber auch andern Spezies der Gattung L. Kommen als Krankheitserreger beim Menschen in Frage.

[0005] Zum Nachweis der Legionella- Spezies in Wasserproben sind aus der Literatur die Kultivierungs- Methode, auf Polymerase- Kettenreaktionen beruhende Methode sowie die Verwendung monoklonaler Antikörper bekannt. Angewendet wird die Hybridisierung mit fluoreszensmarkiertern Sonden.

[0006] Aus der DE 195 15 891 A1 ist auch ein Verfahren zur Amplifizierung von Nukleinsäuren der Gattung Legionella bekannt. Dieses Verfahren verwendet nicht die Sandwich- Hybridisierungs- Methode.

[0007] Weiter wurde aus der US 5.569.586 A die Anwendung der Sandwich- Hybridisierung- Methode bekannt. Diese Methode basiert auf der Nutzung von zwei Oligonukleotid- Sonden einer Fänger- Sonde und einer Nachweis- Sonde. Die Fänger- Sonde ist Kovalent an einen festen Untergrund gebunden. Zunächst hybridisiert die zu untersuchende Ziel- Nukleinsäure bei spezifischen Temperaturen mit den beiden Sonden. Danach bindet die Ziel- Nukleinsäure und der Sondenkomplex an den festen Untergrund der Fänger- Sonde. Der Nachweis kann mit Fluoreszenz oder Chemilumineszenz, Farbreaktionen oder radioaktiven Markierungen erfolgen. Aus der Veröffentlichung Rautio et.al: Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNA s in crude cell lysates. Microb. Cell Fact. (28.04.2003 2 (1)4, S. 1-19), ist weiter ein Sandwich- Hybridisierungs- Assay für Hefen bekannt.

[0008] Wichtig für den Erfolg dieser Methoden sind die Eigenschaften der Sonden für die jeweilige spezifische Hybridisierung. Das wird durch den bisherigen Stand der Technik nur teilweise gewährleistet.

Aufgabenstellung

[0009] Die Aufgabe der Erfindung besteht deshalb darin, neue gattungs- und artspezifische Oligonukleotide zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella herzustellen und zu verwenden.

[0010] Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß

- a) zum Nachweis der gesamten Gattung Legionella als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGTCAAGGGTAGG;
- b) zum Nachweis von Legionella pneumophila als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCT-GACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TTCGCCGC-CCTCTGTATCG-3';
- c) zum Nachweis von Legionella feeleii als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGCACAACTAACCTCATTCA-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAAC-CACCTACGCACC-3' und
- d) zum Nachweis von Legionella jordanis als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CT-TACGGTCCCCAGCTTTT-3' verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von fünfzig bis

fünfundfünfzig Grad Celsius erfolgt.

[0011] Die wichtigsten Daten der neuen Oligonukleotid-Sonden sind in nachfolgender Tabelle 1 dargestellt.

Name der Sonde	Sequenz	Ziel-Spezies	Position	Sonde in der 16SrRNA	Spezifische Hybridisierung	Rungs-Temp.
legpneu 1	5'-TTCGCCGCCCTCTGTATCG-3'	L.	575-594	Nachweis		50°C
legpneu 2	5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3'	pneumo- phila	626-643	Fänger		
legfeel 1	5'-GCGCCACTAACCTCATTCA-3'	L.	840-859	Fänger		55°C
legfeel 2	5'-TATACAACCACCTACGCACC-3'	feelie	575-594	Nachweis		
legjor 1	5'-CTTACGGTCCCCAGCTTTT-3'	L.	192-211	Nachweis		55°C
legjor 2	5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3'	jordanis	435-454	Fänger		
legall 11	5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3'	Genus	433-451	Fänger		
legall 22	5'-CACTGTATGTCAAGGGTAGG	legionella	983-1001	Nachweis		50°C

[0012] Bei artspezifischen Nachweisen von Legionella-Spezies sind gemäß Patentanspruch 2 die Oligonukleotide für Fänger-Sonden und Nachweis-Sonden gegeneinander austauschbar.

[0013] Weiterhin werden die Nachweise von Bakterien der Gattung Legionella gemäß Patentanspruch 3 mit Kombinationen von Oligonukleotiden für gattungsspezifische Sonden und Oligonukleotiden für artspezifische Sonden vorgenommen.

[0014] Von Vorteil ist weiter, daß die neuen gattungs- und artspezifischen Oligonukleotid-Sonden alle für eine Hybridisierung bei Temperaturen von 50–55°C entwickelt wurden. Damit sind Kombinationen von mehr als 2 Sonden möglich, welche die Voraussetzung für den Nachweis von mehr als 1 Legionella -Spezies in einem Test sind. Hierzu werden magnetische Beads mit verschiedenen zum Nachweis von einzelnen Legionella-Spezies Fänger-Sonden gemischt (Multiplex-Analyse) beispielsweise Fänger-Sonden zum Nachweis von L. p. mit Fänger-Sonden zum Nachweis von L. f. oder anderen in Kombination mit einer gattungsspezifischen Nachweis-Sonde.

Ausführungsbeispiel

[0015] Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden unter Hinweis auf die beigefügte Zeichnung näher erläutert.

[0016] Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Sandwich-Hybridisierungs- Methode.

[0017] Dabei ist die Fänger-Sonde 1 mit Biotin 4 markiert; bindet an mit Streptavidin 5 ummantelte magnetische Kugeln (magnetic beads) 7. Nach erfolgter Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure mit den beiden Sonden 1 und 2 geschieht der Nachweis mit Alkalischer Phosphatase 6 die an die Digoxigeninmarkierte Nachweissonde 2 über Anti DIG Fab Fragment bindet. der Nachweis des amplifizierten Fluoreszenz- Signals kann durch ein

Fluoreszenz- Lesegerät quantifiziert werden. Eine weiter Nachweismöglichkeit ist die Erfassung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch elektrochemische Sensoren.

[0018] Zur Probenaufbereitung werden Gesamt- DNA -Proben verschiedener Legionella- Spezies verwendet. Die 16S ribosomale DNA (rDNA) wurde aus der gesamt DNA verschiedener Legionella- Spezies unter Verwendung der fD1 und rP2- Universal- Primer für die 16SrDNA mittels PCR amplifiziert. Der Promoter- Bereich der T7 Polymerase war im fD1 enthalten. In vitro transkribierte 16SrRNA wurde von den entsprechenden PCR Produkten aus Legionella (16SrDNA) unter Verwendung des DIG RNA Labeling- Kit (SP6/T7) (Roche) oder des MAXIscript- Kits/Ambion hergestellt.

[0019] Die Wirksamkeit der Oligonukleotide- Sonden wurde durch die Slot- Blot- Methode getestet. In vitro transkribierte 16SrRNA (Ribosomale RNA der kleinen Untereinheit der Bakterien-Ribosomen) wurde das Ziel- Molekül verwendet.

[0020] Die Slot- Blot- Hybridisierungen wurden entsprechend des Protokolls des DIG System User's guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim (1995) durchgeführt. 1000 fmol in vitro Transkribierter 16SrRNA verschiedener Legionella- Spezies wurden in RNA- Lösungs- Puffer (DEPC- HO, 20 × SSC), Formaldehyd (5:3:2) präpariert und für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend werden die Proben mittels eines Vakuum- Slot- Blotter-(Bio- Rad) auf eine positive geladene Nylon- Membran (Hybond- N) aufgebracht. Diese Membran war vor und nach dem Blotten mit 20 × SSC (3M NaCl und 300 mM Natriumcitrat pH 7,0) gewaschen worden. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit UV- Licht (für 2 Minuten) an die Membranen gebunden. Die Abkürzungen „M“ und „mM“ stehen für die Einheiten mol/1 bzw. mmol/1.

[0021] Die Prä- Hybridisierung wurde in Hoch- SDS- Puffer (7% SDS, 50% Formaldehyd, 5 × SSC, 2% Blocking Reagent (Roche), 50 mM Natriumphosphat pH und 0,1 % Laurylsarcosin) für 2 Stunden bei Hybridisierungs- Temperaturen durchgeführt. Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht in Hoch- SDS- Puffer mit 100 pmol DIG- markierter Oligonukleotid- Sonde bei 50–55°C abhängig von der Schmelztemperatur der Sonde. Die Proben wurden am 3'-Ende mit dem DIG Oligonukleotide 3'End

[0022] Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH) entsprechend des Protokolls des Herstellers mit Digoxigenin markiert.

[0023] Nach der Hybridisierung wurde die Membran zwei Mal mit 2 × SSC; 0,1 % SDS für 5 Minuten gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 0,1 × SSC; 0,1 % SDS, 0,2 × SSC; 0,1 % SDS oder 0,5 × SSC; 0,1 % SDS für 20 Minuten bei Hybridisierungstemperatur, um die ungebundene Sonde zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in Maleinsäure-Puffer (0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl, pH 7,5) mit 0,3 % Tween 20™ für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindung der Alkalischen Phosphatase zu vermeiden. Die Membran wurde für 30 Minuten in Maleinsäure-Puffer mit 0,1% Blocking Lösung (Roche) inkubiert. Anschließend wurde die Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase (AP) 1 : 20 000 in Maleinsäure-Puffer mit 1% Blocking Lösung verdünnt und die Membran in der Antikörper-Lösung 30 Minuten inkubiert. Die Membran wurde 2 mal mit Maleinsäure-Puffer mit 0,3% Tween 20 für 15 Minuten gewaschen und für 5 Minuten in Nachweis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5 und 100 mM NaCl) äquilibriert. Das als Substrat für die Alkalische Phosphatase benutzte CDP-Star™ Substrat (Roche) wurde 1:100 in Nachweis-Puffer verdünnt, auf die Oberfläche der Membran aufgetragen und in Plastik-Folie eingeschweißt für 10 Minuten inkubiert. Die Membran wurde exponiert (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Zeitraum war zuerst 1 Stunde und später 10 oder 5 Minuten um die Färbung des Hintergrundes zu reduzieren.

[0024] Die Ergebnisse der Slot-Blot-Test's zeigen folgendes.

1. Sonden zum Nachweis der Gattung Legionella

Die Sonde Legall 11 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16SrRNA aller untersuchten Legionella Spezies (15 Arten – siehe Tabelle 2, S.8). Die Bindung war spezifisch für alle Legionella- Spezies.

Die Sonde Legall 22 hybridisierte ebenfalls spezifisch mit der in vitro transkribierten 16SrRNA aller untersuchten Legionella- Spezies.

Beide Sonden sind für einen Nachweis der Gattung Legionella im Sandwich-Hybridisierungsnachweis mit Legall 11 als Fängersonde und Legall 22 als Nachweissonde geeignet. Die Hybridisierungstemperatur war 50°C.

2. Sonden zum Nachweis von Legionella pneumophila Die Sonde Legpneu 1 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16S rRNA der Legionella pneumophila Serogruppe 1 ATCC33152, Legionella pneumophila Serogruppe 6, Legionella pneumophila Philadelphia I JR32 WT und mit Legionella micdadei.

Die Sonde Legpneu 2 hybridisiert mit in vitro transkribierter 16S rRNA von Legionella pneumophila Serogruppe 1 ATCC33152, Legionella pneumophila Serogruppe 6 und Legionella pneumophila Philadelphia I JR32 WT. Diese Sonde ist hochspezifisch und kann als Fänger-Sonde mit der Legpneu1-Sonde in Sandwich-Hybridisierungs-Nachweisen verwendet werden. Die Hybridisierungs-*per*-Temperatur war 50°C.

3. Sonden zum Nachweis von Legionella feeleii

Die Sonde Legfeel 1 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella feeleii und ist spezifisch. Sie kann als Fänger-Sonde zusammen mit Legfeel 2 zum Nachweis von Legionella feeleii benutzt werden.

Die Sonde Legfeel 2 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella feeleii und ist spezifisch. Sie kann als Nachweis-Sonde verwendet werden, weil sie eine niedrige Bindungseffizienz besitzt als die Sonde Legfeel 1.

Diese beiden Legfeel-Sonden können zum Nachweis von Legionella feeleii in Sandwich-Hybridisierungs-Ansätzen verwendet werden. Die spezifische Hybridisierungs-Temperatur beider Sonden war 55°C.

4. Sonden zum Nachweis von Legionella jordanis

Die Sonde Legjor 2 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella jordanis und Legionella feeleii. Die Bindung mit der Legionella jordanis-Probe war spezifisch und die Bindung mit der Legionella feeleii-Probe war unspezifisch. Diese Sonde kann als Nachweis-Sonde zusammen mit der Legjor1-Sonde verwendet werden.

Die Sonde Legjor 1 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von Legionella jordanis. Die Bindung dieser Sante zum Zielmolekül war spezifisch. Die Sonde kann als Fänger-Sonde zusammen mit der Sonde Legjor 2 verwendet werden. Die Hybridisierungs-Temperatur für beide Sonden war ebenfalls 55 °C.

[0025] Die Vorteile der Erfindung bestehen darin, daß die neuen Oligonukleotide gattungs- und artspezifisch für die Sandwich-Hybridisierungs-Methode besonders geeignet sind. Vorteilhaft wirkt sich weiter der Einsatz von Kombinationen der neuen Oligonukleotide aus. Möglich sind auch Kombinationen mit anderen Oligonukleotid-Sonden z.B. für den Einsatz als Primer für PCR, fluoreszenzmarkiert für mikroskopische Nachweise, zur Fluoreszenzsandwichhybridisierung und zur Sandwich-Hybridisierung mit elektrischer Signalauslesung.

Tabelle 2 : Untersuchte Legionella Spezies

Legionella Spezies	SONDEN							
	Legall11	Legall22	Legpneu1	Legpneu2	Legfeel1	Legfeel2	Legjor2	Legjor1
L. bozemani	0	0						
L. dumoffii	0	0						
L. erythra	0	0						
L. feelei	0	0			0	0	2	
L. gormanii	0	0						
L. hackeliae	0	0						
L. israelensis	0	0						
L. jordanis	0	0					0	0
L. longbeachae	0	0						
L. micdadei	0	0	1					
L. oakridgensis	0	0						
L.p. 1 ATCC 33152	0	0	0	0				
L.p. gorby WT	0	0						
L.p.philadelphia JR32 WT	0	0	0	0				
L.p.philadelphia serogr. 6	0	0	0	0				
Hybridisierungstemp.	50	50	50	50	55	55	55	55
Waschpuffer	A	A	B	B	A	A	A	A

Sequenzprotokoll

<110> Breitenstein, Antje

<120> Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella

<140> 103 38 123.6

<141> 15.08. 2003

<160> 8

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> ttgcggcc tctgtatcg

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> atctgacgtt cccaggtt

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Legionella feelei[~]

<400> ggcggactaa cctcattcat

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Legionella feelei[~]

<400> tatacaacca cctacgcacc

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Legionella jordanis

<400> cttacgggcc ccagctttt

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Legionella jordanis

<400> ccactccccc ccactgaaag

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Legionella sp.

<400> cctccccc actgaaagt

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Legionella sp.

<400> cactgtatgt caagggttagg

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der Sandwich-Hybridisierungs-Methode dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) gattungsspezifisch zum Nachweis der Gattung Legionella als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGT-CAAGGGTAGG,
 - b) artspezifisch zum Nachweis von Legionella pneumophila als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TTCGCCGC-CCTCTGTATCG-3';
 - c) artspezifisch zum Nachweis von Legionella feeleii als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGCCACTAACCTCATTCA-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAAC-CACCTACGCACC-3' und
 - d) artspezifisch zum Nachweis von Legionella jordanis als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCATCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CT-TACGGTCCCCAGCTTTT-3';verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von 50-55° C erfolgt.

2. Verfahren gemäß Patentanspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass bei artspezifischen Nachweisen von Legionella Spezies die Oligonukleotide für die Fänger-Sonden und Nachweis-Sonden gegeneinander austauschbar sind.

3. Verfahren gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweise mit Kombinationen von Oligonukleotiden für gattungsspezifische Sonden und Oligonukleotiden für artspezifische Sonden vorgenommen werden.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

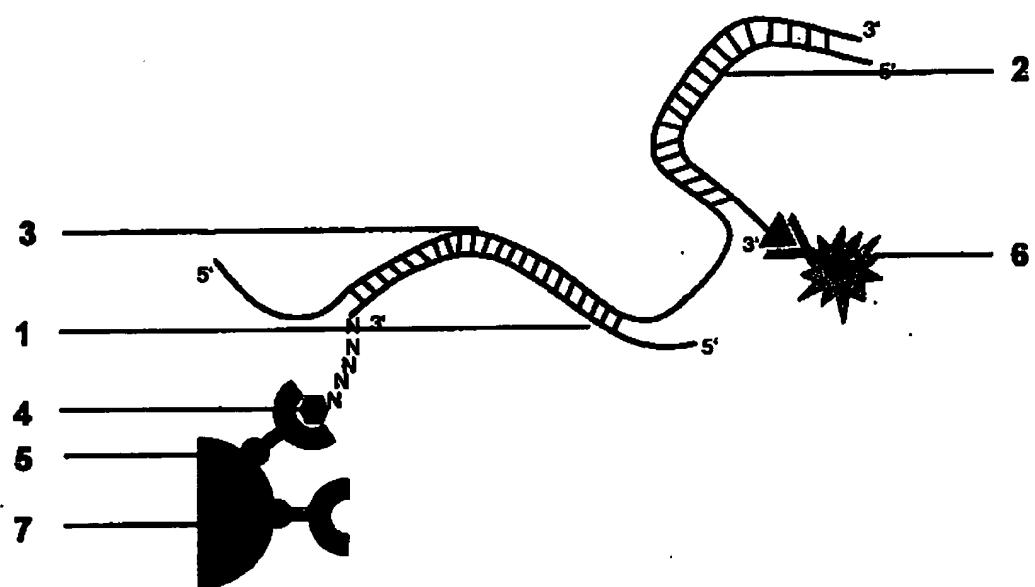


Fig. 1